



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM INGREDIENTES E RAÇÕES PARA SUÍNOS

JANAÍNA NONES

Florianópolis
novembro/2010

Janaína Nones

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM
INGREDIENTES E RAÇÕES PARA SUÍNOS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Santiago Francisco Yunes

Co-orientadora: Vildes Maria Scussel

Florianópolis
novembro/2010

Janaína Nones

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM
INGREDIENTES E RAÇÕES PARA SUÍNOS**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Santiago Francisco Yunes
Orientador

Profa. Vildes Maria Scussel
Co-orientadora

Profa. Dilma Maria de Oliveira Marconi

Prof. Fabio Peres Gonçalves

Florianópolis
novembro/2010

Agradecimentos

- Agradeço a Deus por guiar-me pelos caminhos que me levaram até este momento, tão importante em minha vida.
- Aos meus pais pelo carinho, paciência, incentivo e por todo esforço para a concretização das minhas realizações.
- À Prof^a Vildes M. Scussel, pelo reconhecimento, oportunidades e por ser um exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa.
- Ao professor Santiago Francisco Yunes por compartilhar comigo seus conhecimentos e sua amizade.
- Meus irmãos, Jader e Juliane, que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.
- A meu namorado Alex pelo amor, força e companheirismo.
- Ao pessoal do LABMICO, que mais do que amigos são uma segunda família.
- Todos aqueles que tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. ÍNDICE DE FIGURAS	07
2. ÍNDICE DE TABELAS	08
3. LISTA DE ABREVIATURAS	09
4. RESUMO.....	10
5. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
6. REVISÃO DA LITERATURA	13
6.1. Micotoxinas versus Suinocultura	13
6.1.1. <i>Fumonisin</i> as	14
6.1.2. <i>Zearalenona</i>	16
6.1.3. <i>Aflatoxina</i>	16
6.1.4. <i>Ocratoxina A</i>	18
6.1.5. <i>Esterigmatocistina</i>	19
6.2. Legislação sobre micotoxinas.....	19
6.3. Métodos de detecção para micotoxinas.....	21
6.3.1. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	23
6.4. Validação de métodos analíticos	24
7. OBJETIVOS	25
7.1. Geral	25
7.2. Específicos.....	25
8. METODOLOGIA	26
8.1. Material	26
8.1.1. <i>Amostras</i>	26
8.1.2. <i>Padrões</i>	29
8.1.3. <i>Reagentes</i>	29
8.1.4. <i>Equipamentos</i>	29
8.2. Métodos.....	30
8.2.1. <i>Análise de micotoxinas</i>	30
<u>8.2.1.1. Análise de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e</u> <u>esterigmatocistina</u>	30
<u>8.2.1.2. Análise de fumonisin</u> as B ₁ e B ₂	31
8.2.2. <i>Determinação da umidade</i>	33
8.2.3. Avaliação da estrutura e organização da propriedade.....	33
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
9.1. Avaliação da contaminação por micotoxinas em ingredientes para rações de suínos	34
9.1.1. <i>Fumonisin</i> as	34
9.1.2. <i>OTA, EST, ZON e AFLs</i>	35

9.2. Conteúdo de umidade das amostras de ingredientes e rações para suínos <i>versus</i> micotoxinas	36
9.3. Avaliação das condições higiênico sanitárias da propriedade	37
9.3.1. <i>Armazenagem e processamento dos ingredientes e rações</i> ..	37
9.3.2. <i>Instalações e manejo dos animais</i>	38
9.4. Controle de natalidade de suínos e sua relação com a presença de micotoxinas nas rações	39
10. CONCLUSÕES	42
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas onde pode ocorrer contaminação por micotoxinas.....	13
Figura 2 - Estrutura das fumonisinas.....	14
Figura 3 - Estrutura química da esfinganina e esfingosina.....	15
Figura 4 - Reação de oftaldeído com aminas primárias na presença de mercaptoetanol.....	15
Figura 5 - Estrutura química da zearalenona.....	16
Figura 6 - Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	17
Figura 7 - Mecanismo de ação da aflatoxina B ₁	18
Figura 8 - Estrutura química da ocratoxina A.....	19
Figura 9 - Estrutura química da esterigmatocistina.....	19
Figura 10 - Fundamento da técnica de imunoensaio.....	23
Figura 11 - (a) Localização geográfica do município de Doutor Pedrinho no estado de Santa Catarina (b) Foto da propriedade.....	26
Figura 12 - Fluxograma de coleta de amostras de milho e soja.....	27
Figura 13 - Fluxograma de amostragem de rações, casquinha de soja e farelo de arroz.....	27
Figura 14 - Fluxograma do método de análise de multitoxinas.....	31
Figura 15 - Fluxograma do método de análise de fumonisinas.....	32
Figura 16 - Fluxograma do método de análise de umidade.....	33
Figura 17 - Conteúdo de umidade dos ingredientes utilizados para o preparo das rações para suínos.....	37
Figura 18 - Conteúdo de umidade das rações administradas aos suínos no período de agosto a setembro de 2010.....	37
Figura 19 - Armazenamento dos grãos em silos à granel e/ou sacarias:: (a) soja; (b) milho; (c) farelo de arroz e casquinha de soja.....	38
Figura 20 - Instalações da propriedade onde foram realizados os estudos da qualidade de ingrediente e rações para suínos.(a) amamentação; (b) bebedouro para alimentação do suíno; (b) leitão; (c) suínos na fase de engorda.....	39
Figura 21 - Alterações em leitões observados durante o parto: (a) e (b) natimortos. (c) mumificados.....	39
Figura 22 - Total de suínos nascido entre 2007 e 2010.....	40

2. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos de micotoxinas da Proposta de Resolução em Consulta Pública da ANVISA	20
Tabela 2 - Níveis máximos permitidos para AFLs em alimentos para consumo humano	21
Tabela 3 - Dados sobre a coleta das amostras de ingredientes e rações	28
Tabela 4 - Análises de fumonisinas em ingredientes para suínos avaliadas em 2006	34
Tabela 5 - Análises de fumonisina em rações para suínos avaliadas em 2006.....	35
Tabela 6 - Conteúdos de umidade nas amostras de ingredientes e rações para suínos avaliados em 2010.....	36
Tabela 7 - Controle de natalidade 2007 a 2010	41

3. LISTA DE ABREVIATURAS

AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFLs	Aflatoxinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EST	Esterigmatocistina
FBs	Fumonisinhas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LMT	Limite Máximo Tolerável
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
OPA	O-oftaldialdeído
OTA	Ocratoxina A
ZON	Zearalenona

4. RESUMO

O estágio foi realizado no Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares (LABMICO), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade dos diferentes *ingredientes* (milho, soja, farelo de arroz, casquinha de soja), resíduo da pré-limpeza do milho e tipos distintos de *rações* (gestação, engorda e inicial), para suínos. As amostras foram obtidas de uma propriedade rural de suinocultura localizada no Vale do Itajaí em Santa Catarina. Coletadas de forma representativa nos silos e galpões da propriedade obtendo um total de 1 kg de cada tipo de amostra. Os *ingredientes* para rações foram coletadas de silos de 20 e 50 toneladas para soja e milho, respectivamente e as amostras de farelo de arroz e casquinha de soja de sacas (60kg) 50 e 60 unidades, respectivamente. O resíduo da pré-limpeza do milho foi coletado através de uma peneira que antecede o processo de moagem do milho. Quanto às amostras de *ração*, foram coletados três tipos distintos (ração de engorda, inicial e gestação) de sacas de 25 kg. Foram empregados métodos cromatográficos para detectar a presença de aflatoxina (AFLs), zearalenona (ZON), ocratoxina A (OTA), esterigmatocistina (EST) sendo que das 44 amostras nenhuma apresentou contaminação por estas toxinas. Já para fumonisinas (FBs) 20 amostras foram analisadas, sendo que 35% (7 amostras) apresentaram contaminação. Foi possível observar que dos ingredientes avaliados, duas amostras de milho apresentaram contaminação por FB₁ com 0,238 e 0,830 mg.kg⁻¹ e FB₂ com 0,104 e 0,340 mg.kg⁻¹ = FBs total: 0,342 e 1,17 mg.kg⁻¹. Já, os outros ingredientes (soja, farelo de arroz e casquinha de soja) avaliados, não apresentaram contaminação pelas toxinas de *Fusarium* dentro dos limites de detecção e quantificação do método utilizado. O nível médio de FB₁ nas rações de gestação e engorda (4 amostras) foi de 0.216 mg.kg⁻¹ (0,124 min.; 0,325 máx.) e de FB₂ 0,075 mg.kg⁻¹ (0,04 min; 0,110 máx.), sendo que 2 amostras foram isentas de contaminação. Como esperado, o maior nível de contaminação por FBs totais foi registrado em amostras de resíduos da pré-limpeza do milho com 8,50 mg.kg⁻¹. Foram também verificadas as condições de armazenamento e processamento dos ingredientes e rações, como umidade, a qual pode ocasionar o desenvolvimento fúngico. Os dados de natalidade da propriedade foram avaliados e correlacionados com possíveis contaminações por micotoxinas na alimentação. O estágio realizado colaborou para o discernimento e o aprimoramento de conhecimentos químicos empregados em análises de micotoxinas. Sendo que as contaminações encontradas por fungos do gênero *Fusarium*, indicam que é necessário o estabelecimento de uma legislação para todas as micotoxinas. Além de ser necessário um constante monitoramento da presença de toxinas na alimentação para evitar eventuais danos na saúde animal.

Palavras- chave: micotoxinas, contaminação, ingredientes, suínos.

5. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil possui um grande potencial zootécnico, sendo que o estado de Santa Catarina representa grande percentual da produção de carnes suínas do país. Mediante a este fato, tem se procurado cada vez mais tecnologias que aprimorem a criação destes animais, visando menores custos de produção e maiores lucros *per capita*.

Novas tecnologias tem melhorado a genética e a qualidade dos galpões para a criação e conseqüentemente a qualidade das carnes. Porém existem outros fatores que interferem na qualidade do produto final, que será destinado ao consumo humano. Alguns destes fatores são as contaminações, que podem ser tanto químicas, microbiológicas ou toxicológicas.

A contaminação toxicológica pode ocorrer durante todo o percurso do desenvolvimento do suíno, caso não haja um monitoramento da qualidade das rações. Substâncias tóxicas como micotoxinas, as quais são geradas por cepas de fungos filamentosos, podem estar presentes nas rações ocasionando problemas reprodutivos e de produção.

Os principais problemas ocasionados pela presença destas substâncias é o aumento do número de leitões mumificados, natimortos, problemas de fertilidade das fêmeas, como falso cio e abortos. Pode ainda ser observado edema pulmonar, baixa na imunidade, redução do ganho de peso, problemas hepáticos e renais.

Condições inadequadas no processamento e armazenamento das rações podem ocasionar o desenvolvimento fúngico aumentando as chances de encontrar as micotoxinas. Altas temperaturas e umidade elevada são os principais fatores para o aumento da presença destes microorganismos. Nem sempre os fungos indicam que a ração ou matéria prima (ingredientes) está contaminada por micotoxinas, e a ausência destes também não indica a presença destas toxinas.

Os principais ingredientes presentes nas rações são: milho, soja, casquinha de soja, farelo de arroz, sendo que estes são utilizados no processamento de distintos tipos de rações conforme a faixa etária e a fase de vida do animal. Gestação, inicial e engorda são algumas das rações utilizadas no ciclo completo de um plantel de suínos considerando todas as etapas de produção.

Considerando a importância da suinocultura na economia de nosso estado e também na qualidade da alimentação humana, uma vez que a presença da micotoxina pode entrar na cadeia alimentar humana através da carne suína, é de fundamental importância o controle destas substâncias nos criatórios de suínos.

Portanto, tem se procurado técnicas eficientes que consigam detectar e monitorar a presença de micotoxinas na cadeia produtiva do suíno. Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boa Práticas de Fabricação (BPF) e avaliação das condições higiênico sanitárias da propriedade devem ser implementadas. Por este fato, é necessário a verificação da presença de micotoxinas nas propriedades.

Para este estudo foi escolhida uma propriedade rural localizada no vale do Itajaí no estado de Santa Catarina, onde foram avaliadas as micotoxinas em ingredientes e rações, através de técnicas cromatográficas. O controle de umidade das rações e o levantamento dos dados reprodutivos da propriedade também foram realizados com o intuito de melhorar a qualidade sanitária visando uma maior renda e qualidade alimentar.

6. REVISÃO DA LITERATURA

6.1. Micotoxinas *versus* Suinocultura

A importância de avaliar a qualidade das carnes está no grande potencial zootécnico que o Brasil possui atualmente. Por este motivo é importante avaliar a qualidade do plantel, controlar a nutrição, instalações, sanidade, manejo e genética. Com relação à nutrição, tem se procurado rações com composições nutricionais adequadas e isentas de contaminação (química, microbiológica ou toxicológica).

As micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas cepas de fungos filamentosos (DIKIN, 2002). Sua presença em alimentos pode causar danos à saúde pública e animal e também prejuízos econômicos na agricultura. São descritas cerca de 300 micotoxinas, produzidas por aproximadamente 200 fungos diferentes. Entretanto, apenas cerca de 20 dessas micotoxinas são encontradas em alimentos e rações, em níveis que possam ser considerados de risco para a saúde (ANKLAM et al., 2002).

A contaminação por micotoxinas em rações para suínos desencadeia vários problemas relacionados com: baixa na imunidade, surgimento de doenças, redução do ganho de peso, prejuízos reprodutivos e de produção.

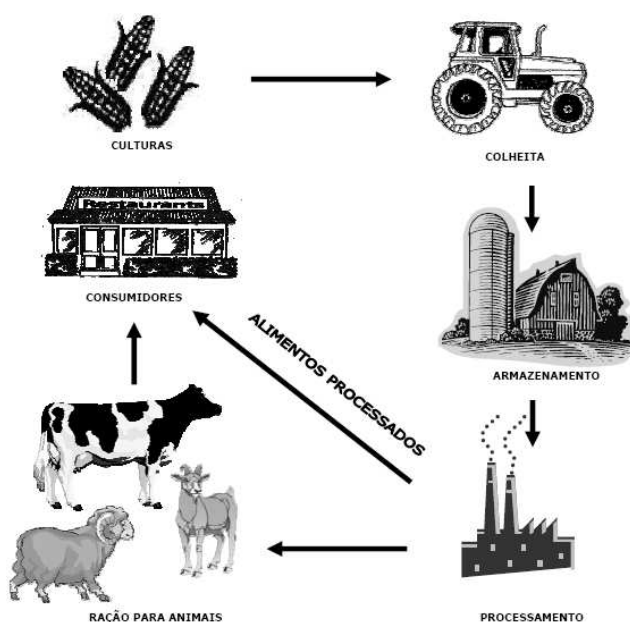


Figura 1: Etapas onde pode ocorrer contaminação por micotoxinas (RODRIGUES et al., 2009).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (Figura 1). O princípio básico para o desenvolvimento fúngico é o elevado teor de água no alimento e temperatura elevada. Muitas micotoxinas também têm alta estabilidade química que as habilita a permanecer nos alimentos mesmo após a remoção dos fungos pelos processos de industrialização (BITTENCOURT et al., 2003).

As micotoxinas mais comuns e que afetam a saúde do suíno são as aflatoxinas (AFLs), fumonisinas (FBs), zerealenona (ZON), ocratoxina (OTA) e Esterigmatocistina (Est).

6.1.1. Fumonisinas

Quimicamente, as fumonisinas (FBs) são aminopolióis de cadeia longa (20 carbonos) esterificada no C₁₄ e C₁₅ com dois grupos de ácido tricarboxílico (CASADO et al., 2001). São toxinas produzidas por fungos de diversas espécies do gênero *Fusarium* especialmente por *F. verticillioides*, sendo a FB₁ e FB₂ (Figura 2) as mais comuns, encontradas em alimentos e rações, de um grupo de cerca de 16 FBs existentes.

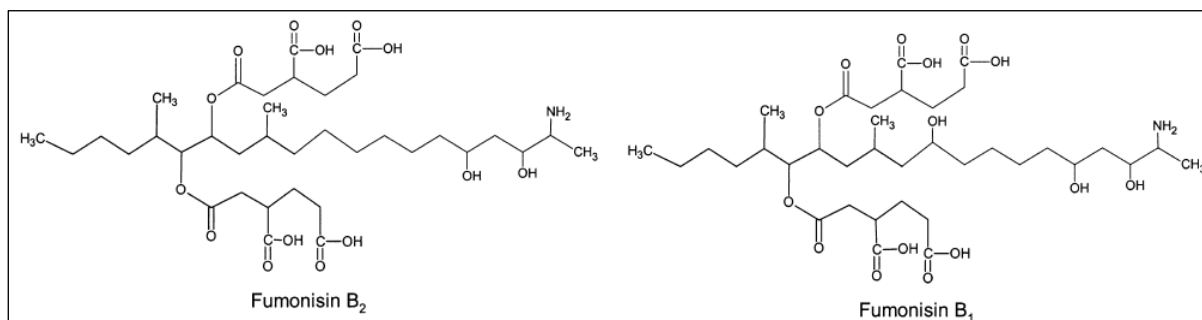


Figura 2: Estrutura das fumonisinas (HUSSEIN et al., 2001).

Os suínos são sensíveis à intoxicação por FBs. As dietas contaminadas por FBs provocam inapetência e depressão, induzindo toxicidade cardiovascular, edema pulmonar e degeneração hepática, e, em concentrações elevadas, podem provocar lesões pancreáticas, hepáticas e renais (LOVATTO et al., 2007). O mecanismo de ação das FBs baseia-se na semelhança de sua estrutura química com a estrutura da esfingosina e esfinganina (Figura 3). Esta semelhança faz com que a molécula de FB interfira na biossíntese de esfingolípídios. A inibição

da biossíntese de esfingolipídios pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que estes componentes têm um importante papel na estrutura da membrana celular, comunicação celular, na interação intracelular e na matriz celular e regulação de fatores de crescimento.

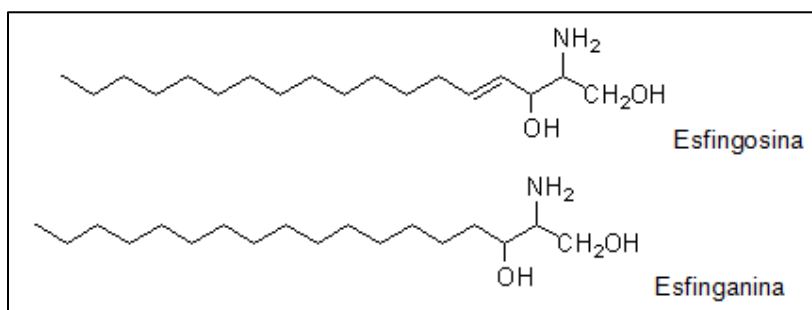


Figura 3: Estrutura química da esfinganina e esfingosina (CELESTE et al., 2007).

Quanto ao método analítico as FBs apresentam um comportamento iônico em solução, assim as separações em colunas de fase reversa são baseadas no mecanismo de troca iônica. Para se conseguir melhores resultados a fase móvel deve ser acídica, o que se consegue através da adição de ácido acético ou fórmico à fase móvel ou pelo uso de um tampão volátil como o acetato de amônio.

Em virtude de se tratar de moléculas fortemente polares, as FBs são solúveis em água e solventes polares e insolúveis em solventes apolares.

O grupamento amino presente na estrutura da FB pode sofrer uma protonação, através da adição de ácido acético, fórmico ou pelo uso de um tampão volátil como o acetato de amônio, fazendo com que a molécula se torne um íon.

Como as FBs não absorvem a luz ultra-violeta ou luz visível, e não são substâncias fluorescentes, elas requerem a sua derivação, através da adição de o-ftaldeído e mercaptoetanol (Figura 4), para que possam ser identificadas e analisadas. A FB₁ e a FB₂ apresentam uma fluorescência verde amarelada após a sua derivação (DIAZ et al., 1994; SHEPARD et al., 1998).

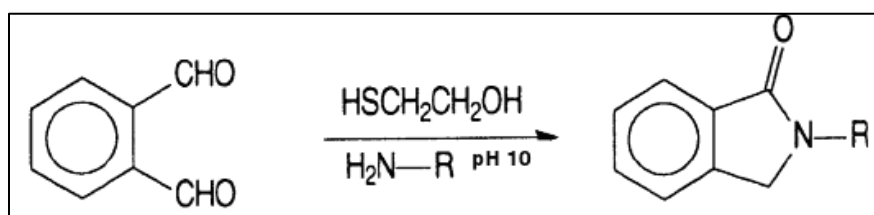


Figura 4: Reação de o-ftaldeído com aminas primárias na presença de mercaptoetanol (CONCA et al., 2001).

6.1.2. Zearalenona

A zearalenona (ZON) é uma toxina produzida pela espécie *Fusarium graminearum*, encontrada principalmente em grãos de milho. Em casos de intoxicações de suínos podem causar: hiperestrogenismo, aborto, natimortos, falso cio, prolapso retal e da vagina, infertilidade, efeminização dos machos com desenvolvimento de mamas. Esta toxina age como hormônio feminino (SCUSSEL, 1998).

Quimicamente é uma lactona macrocíclica (Figura 5) que exhibe fluorescência azul esverdeada em comprimentos de onda de luz ultravioleta (360 nm) e uma fluorescência verde muito intensa quando excitada com comprimento de onda curto de luz ultra violeta (260 nm). É considerada como um composto fitoestrogênico o qual possui grande afinidade pelos receptores estrogênicos.

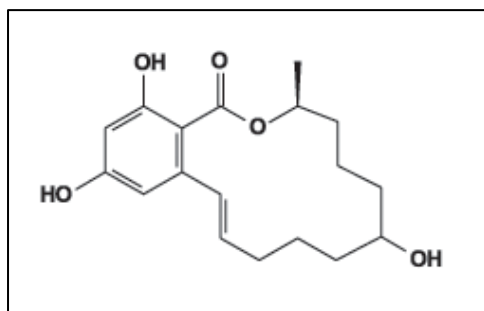


Figura 5: Estrutura química da zearalenona (FARACO et al., 2008)

A ZON aparece em quase todos os produtos de origem agrícola como grãos (trigo e milho) e em alimentos processados como rações, cereais matinais, cerveja e pães (HUSSEIN et al., 2001; GUTLEB et al., 2002; MORGAVI et al., 2007). A toxina liga-se em receptores estrogênicos, influenciando a transcrição estrogênio dependente no núcleo das células.

Estudos têm demonstrado o potencial da ZON em estimular o crescimento de células tumorais de mama em humanos contendo receptores de estrogênio (D'MELLO et al., 1999; CONKOVÁ et al., 2003; VLATA et al., 2006; BINDER, 2007).

6.1.3. Aflatoxina

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Apergilus*, *A.flavus* e *A. parasiticus*, sendo as micotoxinas mais abundantes e mais tóxicas que se conhecem (ALDRED et al., 2004; SANTOS et al.,1998; PITT & HORKING, 1999)

A estrutura química deste grupo é caracterizada pela ligação de dihidrofurano ou tetrahidrofurano a uma estrutura cumarínica (KAWASHIMA, 2004). As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 6), com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada.

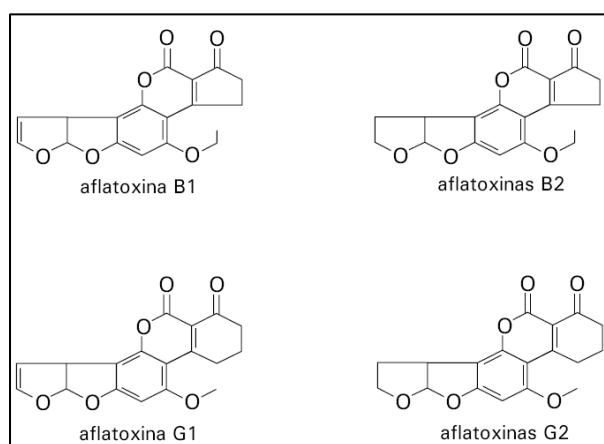


Figura 6: Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (SCUSSEL, 1998).

A toxicidade crônica destas micotoxinas pode levar a alterações hepáticas, redução do crescimento do animal e proteção imunológica. Na toxicidade aguda causa hemorragias subcutâneas e intramusculares resultando na morte do animal. Suínos e caninos são as espécies mais sensíveis, sendo normalmente animais jovens os mais afetados pela aflatoxicose (YU et al., 2005; ZLOTOWSKI et al., 2004; MALLMANN et al. 1994).

O metabólito mais importante é a aflatoxina B₁ (AFB₁), devido à sua elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos. A forma ativada da AFB₁ é o composto identificado como 8,9-epóxido de AFB₁, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranóide da molécula de AFB₁ (Figura 7).

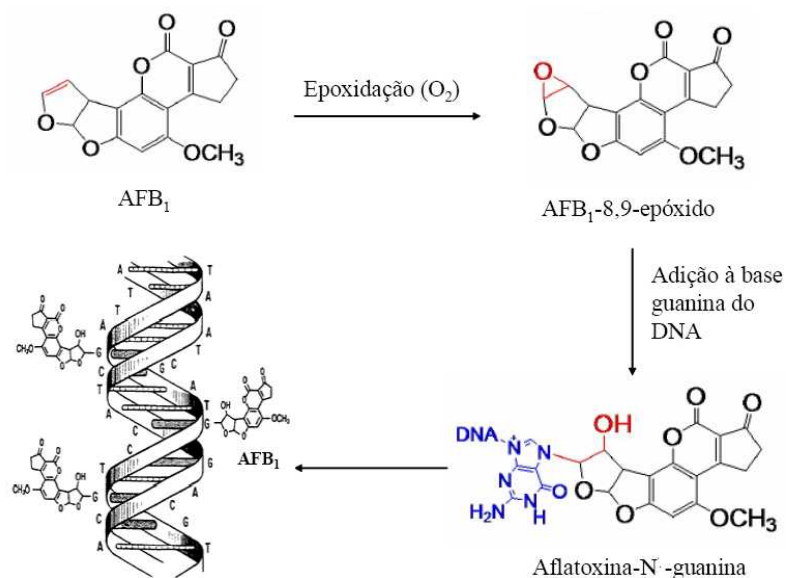


Figura 7: Mecanismo de ação da aflatoxina B₁ (HAYASHI, 2007)

Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. A ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁.

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde estabelece o limite de 20 µg/kg AFB₁+AFG₁ em alimentos de consumo humano, e o Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece o de 50 µg/kg de aflatoxinas totais para matérias-primas de alimentos e rações (CALDAS et.al., 2002)

6.1.4. Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) (Figura 8) foi isolada e identificada no final do ano de 1970 sendo relacionada a doenças renais de equinos e suínos (MORGAVI et al., 2007). É produzida por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* podendo afetar seriamente o desempenho dos animais e seu bem-estar e também ocasionar efeitos deletérios nos humanos, devido à suas propriedades nefrotóxicas e carcinogênicas (MULLER et al., 2004).

O mecanismo de ação tóxica da OTA é experimentalmente atribuído à inibição competitiva de enzimas da cadeia respiratória celular como a ATPase e o

succinato desidrogenase, e da citocromo C oxidase (HUSSEIN et al, 2001). Hussein e Brasel (2001) cita ainda que a ocratoxina tem como outro mecanismo de ação a interrupção da síntese protéica através da ação competitiva do fenilalanil-tRNA sintetase.

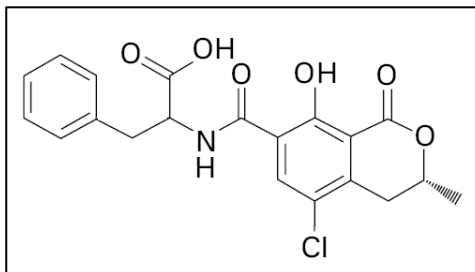


Figura 8: Estrutura química da ocratoxina A (FREIRE et al. , 2007).

6.1.5. Esterigmatocistina

A esterigmatocistina é um intermediário na biossíntese de AFLs e é muito semelhante a AFLs em sua estrutura química e atividade biológica (Figura 9). Ela está quimicamente relacionada a AFLs por conter um grupo dihidrofurano condensado ligado à porção xantona (SCOTT, 1994). Em humanos pode apresentar efeitos carcinogênicos e hepatogênicos, porém não é tão tóxica quando comparada a AFB₁.

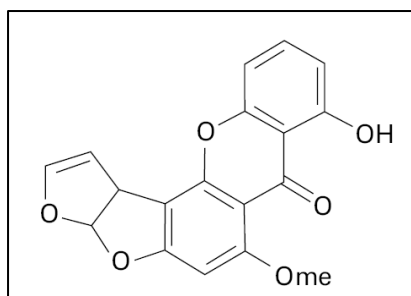


Figura 9: Estrutura química da esterigmatocistina (FREIRE et al. , 2007).

6.2. Legislação sobre micotoxinas

Para evitar os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos e em rações para animais de abate e de estimação várias legislações têm sido adotadas em muitos países. Segundo Van Egmond (2003), aproximadamente 99 países possuem legislação para a presença de aflatoxinas em alimentos e rações o que representa 87% da população mundial.

No Brasil, as AFLs são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Apesar de não existir legislação vigente para as demais micotoxinas vem sendo propostas consultorias pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstrando a preocupação com a saúde nacional (Tabela 1).

Tabela 1: Limites máximos de micotoxinas da Proposta de Resolução em Consulta Pública da ANVISA (Brasil, 2010)

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/Kg)
Aflatoxina M1	Leite Fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
	Outros produtos lácteos	0,5
Aflatoxinas B1 + B2 + G1+ G2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada.	5,0
	Feijão e outra leguminosas	5,0
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas; frutas desidratadas e secas, grãos oleaginosos exceto amendoim e derivados	10,0
	Castanha-do-Brasil com casca	20,0
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10,0
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo posterior	15,0
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	1,0
	Formulas infantis e criança de primeira infância	1,0
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Condimentos e especiarias	20,0
	Amendoim e derivados	20,0
	Milho e derivados	20,0
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10,0
	Feijão e outras leguminosas	10,0
	Café torrado moído ou em grão	10,0
	Café solúvel	10,0
	Vinho e suco de uva	2,0
	Condimentos e especiarias	10,0
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	2,0
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Frutas secas e desidratadas	10,0
Desoxinivalenol	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de trigo, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	2000
	Trigo para quibe	1250
	Outros produtos derivados de trigo	1500
	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	750
		200
Fumonisinias (B1 + B2)	Milho não processado	5000
	Milho pipoca, amido de milho	3000
	Farinha de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2000
	Outros produtos a base de milho	1000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil	200

Zearalenona	Farinha de trigo e derivados de trigo, cereais e produtos a base de cereais inclusive cevada malteada, arroz beneficiado e derivados.	100
	Arroz integral	800
	Farelo de arroz	1000
	Milho não processado	400
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos a base de milho	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil	20

Estes limites são comparáveis aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (SCUSSEL et al., 2010). A Tabela 2 apresenta os limites máximos permitidos em alimentos para consumo humano em diferentes países.

Tabela 2: Níveis máximos permitidos para AFLs em alimentos para consumo humano

País	Nível máximo µg/kg	Alimento
União Européia	2(B1); 4 (total)	Cereais e produtos processados
Austrália	5 (total)	Todos os alimentos
Brasil	20 (total)	Amendoim e derivados de milhos
Índia	30 (total)	Todos os alimentos
Japão	10 (total)	Todos os alimentos
Singapura	0	Todos os alimentos
África do Sul	5 (B1); 10 (total)	Todos os alimentos
Suécia	5 (total)	Todos os alimentos
Estados Unidos	20 (total)	Todos os alimentos
Alemanha	2(B1); 4 (total)	Todos os alimentos
	0,05 (total)	Alimentos infantis

Fonte: CRUZ, 2010

O Ministério da Agricultura (BRASIL, 1988) estabelece que para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal o limite máximo de AFLs presente pode ser de 50 µg/kg de AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂. A União européia estabeleceu como nível máximo o valor de 20 µg/kg para rações destinadas a suínos (FONSECA, 2010).

6.3. Métodos de detecção para micotoxinas

Numerosas técnicas são necessárias para abranger todas as diferenças existentes entre as micotoxinas tais como polaridade, capacidade de

fluorescência, volatilidade e absorção de raios ultravioleta. Além das diferenças entre as micotoxinas, as matrizes analisadas para a presença das mesmas são extremamente variadas e complexas exigindo etapas de limpeza e extração específicas (KATZ et al., 1998; ZÖLLNER et al., 2006).

Alguns métodos de detecção de micotoxinas utilizam princípios imunológicos (imunoensaios); todavia, o emprego de princípios cromatográficos aparece na quase totalidade das situações. De acordo com o objetivo da análise, os métodos podem ser divididos basicamente em triagem e quantificação (NOLLET, 2007).

Um dos métodos de triagem clássicos na análise de micotoxinas é o método da minicoluna. Este método serve apenas para a detecção de AFLs e fundamenta-se na separação da micotoxina presente na amostra durante sua migração no interior de uma minicoluna após a aplicação de um pequeno volume do extrato da amostra seguida de um solvente de eluição. A toxina fica retida na região onde há o adsorvente Florisil. Uma fluorescência é observada na presença de AFLs sob luz ultra-violeta em câmara escura.

Outro tipo de método de triagem muito utilizado é o imunoensaio. Estes métodos são ferramentas muito úteis e tem como fundamento a produção de anticorpos específicos contra determinadas micotoxinas que são imobilizados em um suporte inerte e empacotados em minicolunas. O extrato proveniente do alimento é então passado através da coluna. Enquanto que praticamente todos os compostos do extrato são lavados e eluídos da coluna, as micotoxinas ficam retidas nos anticorpos específicos. Devido ao fato de que as micotoxinas não ficam ligadas covalentemente aos anticorpos, as mesmas podem ser retiradas com o uso de solventes orgânicos como metanol ou acetonitrila. Este eluato contém as micotoxinas em grande concentração e pureza, podendo ser detectadas por métodos cromatográficos. Na Figura 10 é possível observar o esquema do método de imunoafinidade (CAVALIERI et al., 2007).

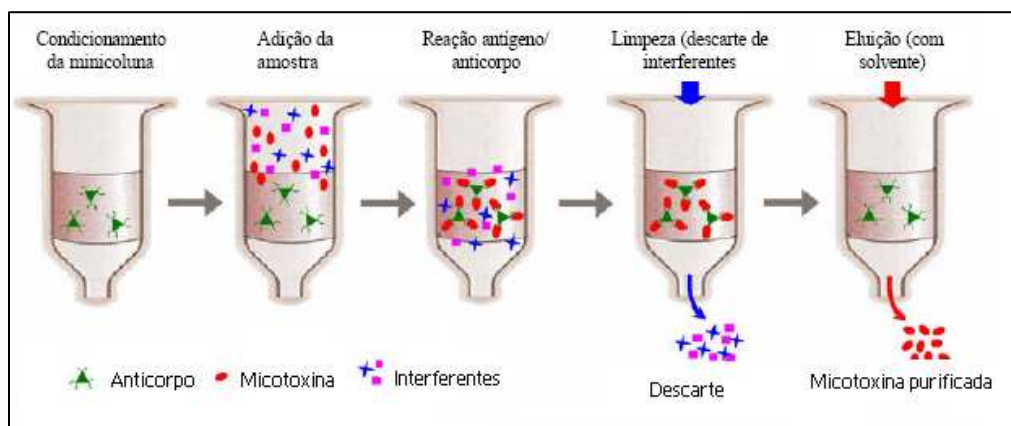


Figura 10: Fundamento da técnica de imunoensaio (KATZ et al, 1998).

A quantificação tem por objetivo avaliar a concentração das micotoxinas em determinada matriz. Os principais métodos para quantificação de micotoxinas são a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de fluorescência (FL), ultravioleta (UV) e de massa (MS) e cromatografia gasosa (CG) acopladas a detectores de captura de elétrons, ionização por chama e de massa (ZÖLLNER et al., 2006).

6.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Entre os vários métodos de análises, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de diferentes espécies (COLLINS et al., 1995).

A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é também conhecida por HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromathography*. Este é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões.

Os componentes que compõem um CLAE são: reservatório da fase móvel, bomba de alta pressão, válvula de injeção, coluna, detector e registrador.

A fase móvel possui um alto grau de pureza estando relacionada ao processo de separação dos analíticos, proporcionando a migração dos compostos ao detector. Ao final do percurso a fase móvel é armazenada em um recipiente e descartada (NIESSEN, 2006; ARDREY, 2003).

A bomba proporciona uma vazão constante para que não ocorram problemas na detecção do sistema. As amostras são introduzidas no equipamento através das válvulas de injeção.

As colunas são constituídas de um cilindro metálico empacotadas com material que serve de fase estacionária. As colunas aplicadas para análise de micotoxinas são geralmente compostas com sílica tratada com polímeros de carbono e dependendo do tamanho da cadeia carbônica ligada à partícula de sílica podem ser: C4, C8 e C18 principalmente.

O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros. O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador.

6.4. Validação de métodos analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para que o método analítico seja aplicável, com características relevantes é necessária sua validação.

A validação corresponde a estudos analíticos que envolvem o laboratório, utilizando o mesmo método para analisar a mesma ou diferentes matrizes, durante um intervalo de tempo determinado. Estes estudos permitem a avaliação do desempenho do método com um numero considerável de experimentos, utilizando diferentes concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adequado às diferentes situações (VAN DER VOET et al. 1999).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO. Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/ 05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de junho/2007 (RIBANI et al., 2004).

7. OBJETIVOS

7.1. Geral

Avaliar a presença e os efeitos de micotoxinas em ingredientes e rações visando à segurança alimentar dos suínos.

7.2. Específicos

- Analisar o teor de fumonisinas, zearalenona, aflatoxina, ocratoxina e esterigmatocistina nos ingredientes (milho, soja, casquinhas de soja, farelo de arroz), resíduo da pré-limpeza do milho e nas rações (gestação, engorda e inicial) para suínos;
- comparar os níveis de contaminação das toxinas permitidos pela legislação brasileira - se são seguros e/ou podem causar danos aos animais;
- avaliar a necessidade de uma legislação vigente para a fumonisina, zearalenona, ocratoxina e esterigmatocistina;
- analisar os dados reprodutivos de propriedade e correlacionar com as micotoxinas presentes na alimentação;
- verificar os possíveis fatores que favorecem a proliferação de fungos e a formação de micotoxinas (nas instalações da propriedade, ingredientes e rações);
- discernir e aprimorar os conteúdos químicos empregados em análises de micotoxinas;
- melhorar a qualidade sanitária visando uma maior renda e qualidade alimentar.

8. METODOLOGIA

8.1. Material

8.1.1. Amostras

As amostras foram obtidas de uma propriedade rural de suinocultura localizada no município de Doutor Pedrinho (Figura 11), no Vale do Itajaí, Santa Catarina.

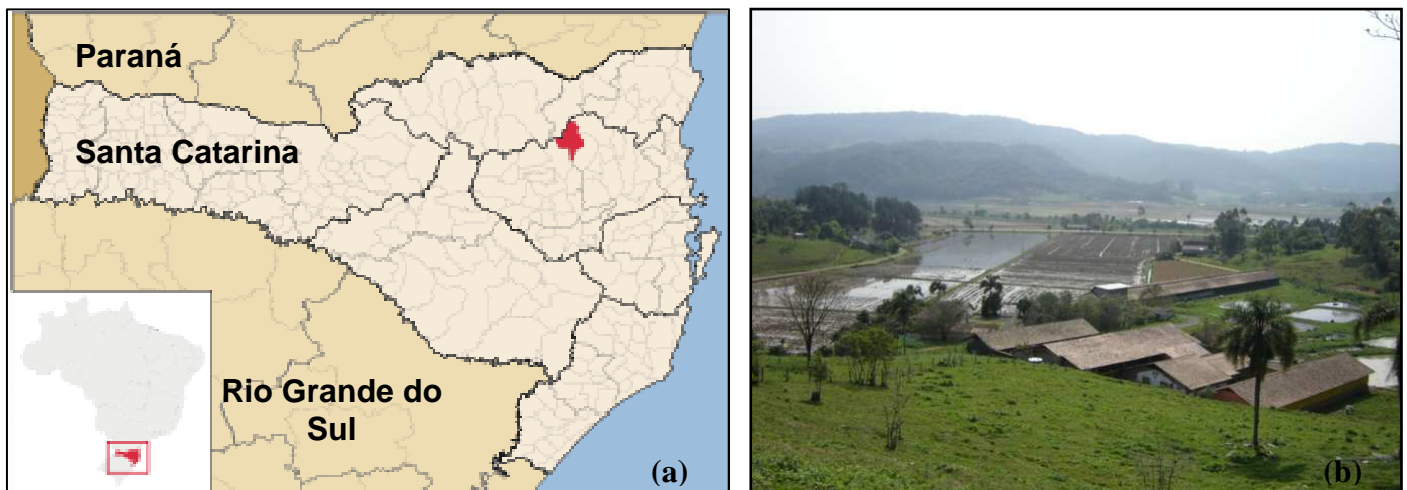


Figura 11: (a) Localização geográfica do município de Doutor Pedrinho no estado de Santa Catarina. (b) Foto da propriedade.

Foram coletadas amostras de *ingredientes* (milho, soja, farelo de arroz e casquinha de soja), *resíduo da pré-limpeza do milho* e tipos distintos de *rações* (gestação, engorda e inicial) em diferentes datas em 2006 e 2010. As amostras foram coletadas de forma representativa nos silos e galpões da propriedade obtendo um total de 1 kg de cada tipo de amostra.

As amostras de milho e soja foram coletadas de silos de 20 e 50 toneladas, respectivamente. Na Figura 12 pode ser visualizado o fluxograma de coleta e preparo das amostras.

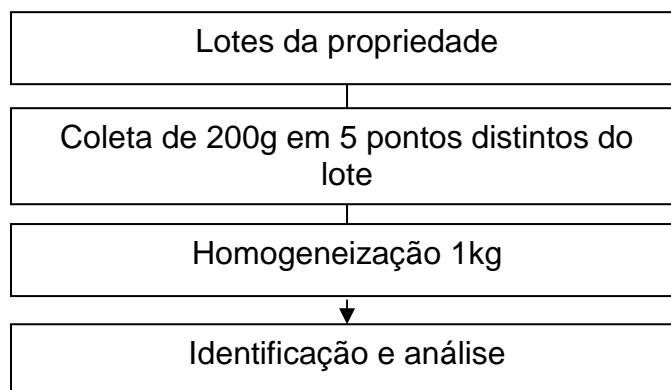


Figura 12: Fluxograma de coleta de amostras de milho e soja.

As amostras de farelo de arroz e casquinha de soja foram coletadas de sacas contendo 60 kg cada, em 50 e 60 unidades, respectivamente. Quanto às amostras de ração, foram coletados três tipos distintos (ração de engorda, inicial e gestação) de sacas de 25 kg.

As amostras de rações, casquinha de soja e farelo de arroz foram coletadas e preparadas segundo o fluxograma apresentado na Figura 13.

Os resíduos de milho remanescentes da pré-limpeza dos grãos, gerados a partir da peneiração antes da moagem, foram também coletados para análise. Na Tabela 3, apresentamos dados sobre as coletas das amostras de ingredientes, resíduo da pré-limpeza do milho e rações.

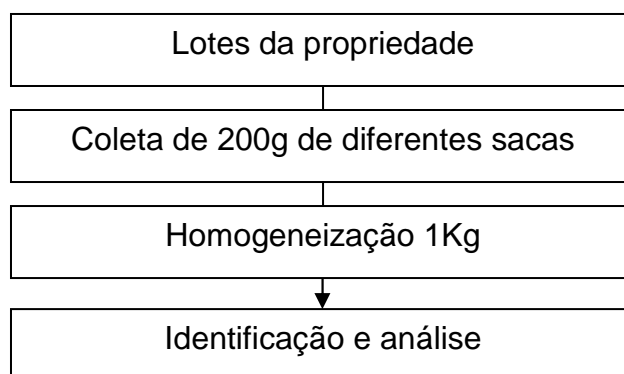


Figura 13: Fluxograma de amostragem de rações, casquinha de soja e farelo de arroz.

Tabela 3: Dados sobre a coleta das amostras de ingredientes e rações

	Total de amostras ¹	Ingredientes				Resíduo Pré- limpeza do milho	Rações			Data da coleta
		Milho	Soja	Casquinha	Farelo de Arroz		Gestação	Engorda	Inicial	
	2	x	NC	NC	NC	x	NC	NC	NC	17/10/06
	6	x	x	x	x	NC	x	x	NC	02/10/06
	6	x	x	x	x	NC	x	x	NC	23/11/06
	6	x	x	x	x	NC	x	x	NC	12/12/06
	6	x	x	NC	x	x	x	NC	x	01/08/10
	6	x	x	NC	x	x	x	NC	x	19/08/10
	6	x	x	NC	x	x	x	NC	x	06/09/10
	6	x	x	NC	x	x	x	NC	x	28/09/10
Total geral	44	8	7	3	7	5	7	3	4	

¹ Quantidade em gramas; NC: amostra não coletada; x: amostra coletada.

8.1.2. Padrões

Os padrões de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), zearalenona, esterigmatocistina e ocratoxina A foram obtidos comercialmente e são da marca Sigma ®, fumonisinas (FB₁, FB₂) fornecidas pelo *Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis* (PROMEC) da África do Sul. Soluções estoques individuais de FB₁ e FB₂ foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo em 10 mL de acetonitrila-água (1+1), segundo Visconti et al. (1994), obtendo uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas em concentrações de 50 µg/mL de FB₁ e FB₂, respectivamente. AFLs, AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, 2,5 µg/mL cada em benzeno. Ocratoxina A, à concentração de 10 e 1 µg/mL em benzeno (Sigma ®). A determinação exata das concentrações foi realizada conforme descrito na AOAC (2005). Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados a -18°C.

8.1.3. Reagentes

Para as análises foram utilizados: (a) reagentes: sulfato de sódio anidro, carbonato de cobre II, ácido fórmico e ácido acético, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, cloreto de potássio, cloreto férrico, ácido sulfúrico, cloreto de alumínio, sulfato de cobre; (b) solventes: acetona, água destilada, clorofórmio, benzeno, metanol, tolueno, acetato de etila; (c) empacotadores: celite e sílica gel G 60. Para a derivatização foi utilizado: o-oftaldialdeído (OPA), metanol, solução de tetraborato de sódio e 2- mercaptoetanol. Todos os reagentes utilizados foram grau P.A. obtidos comercialmente de várias marcas.

8.1.4. Equipamentos

Neste trabalho foram usados os seguintes equipamentos: Balanças semi-analítica e analítica, liquidificador com copo de metal (1L), heating block (40°C), câmara de luz-ultravioleta de comprimentos de onda curto (254 nm) e longo (360 nm), agitador de tubos, cuba cromatográfica, borrifador, bomba de vácuo.

Um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com: válvula de injeção, loop 20µL (Rheodyne ®). Bomba isocrática, detetor de fluorescência (Gilson ®) com comprimento de onda de excitação de 335 nm e de emissão 440 nm. Coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈, 250 mm x 4,6 mm, 5 µ (Phenomenex ®).

8.2. Métodos

8.2.1. Análise de micotoxinas

8.2.1.1. Análise de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina

As determinações das multitoxinas: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, OTA, ZON e EST foram realizadas conforme metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1998). Sendo que o limite de detecção (LOD) para cada multitoxina foi de 1 µg/kg e o limite de quantificação (LOQ) foi de 2µg/kg. Foram utilizados 50 g de cada amostra, extraídas com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4 %. A amostra foi agitada neste meio por 5 min em velocidade moderada, depois filtrada. Foi coletado 150 mL do filtrado e adicionado 150 mL de sulfato de amônio 30 % e 50 mL de celite, agitado moderadamente e filtrado; 150 mL deste novo filtrado foi transferido para funil de separação e as toxinas foram extraídas com 10 mL de clorofórmio por 3 vezes. Os extratos clorofórmicos foram submetidos a evaporação do solvente em banho de 60°C até próximo a secura. Os extratos foram ressuspensos em 200 µL de benzeno/acetonitrila (98 + 2, v/v) e imediatamente submetidos à cromatografia em camada delgada. A eluição foi feita em cuba saturada com o sistema de solventes: tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (60 + 40 + 0,5). Sob luz ultravioleta de comprimento de onda longo ($\lambda = 366 \text{ nm}$) e a determinação feita através da comparação com os padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e OTA, preparados conforme Scott (1994). Na Figura 14, apresentamos o fluxograma do método de análise de multitoxinas aqui descrito.

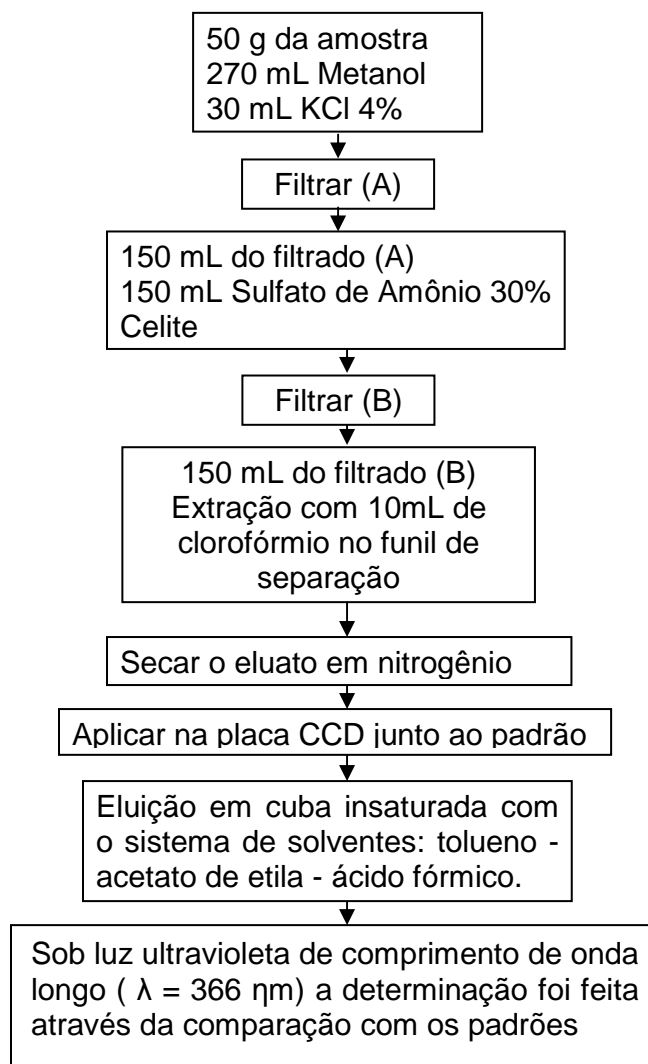


Figura 14: Fluxograma do método de análise de multitoxinas

8.2.1.2. Análise de fumonisinas B₁ e B₂

Foi empregado o método 995.15 da AOAC (2005). Sendo a LOD 0,05 e 0,04 µg/kg para FB₁ e FB₂ respectivamente. A metodologia empregada, conforme fluxograma Figura 15, utiliza metanol/água (CH₃OH-H₂O/3:1) como solvente de extração. A limpeza do extrato foi realizada em colunas de extração em fase sólida (SAX Stata ®).

A derivatização consiste em redissolver extrato purificado em 200 µL de metanol e filtrado em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro. Desta solução é retirado 25 µL e transferidos para frascinho de vidro onde é adicionado 225 µL de solução de o-ftaldeído (OPA) e mantidos à temperatura ambiente para reação de derivatização por 2 min. Em seguida 20 µL da mistura é injetada no

cromatógrafo líquido (CLAE), equipado com detector de fluorescência (λ = excitação 335 nm e emissão 440 nm) .O cálculo das FBs presente no extrato, após e posterior introdução no aparelho, é baseado nas áreas de picos detectados como segue:

$$A(\mu g) = \frac{G \times S}{H}$$

A= FB injetada G= área do pico do extrato da amostra H=área do pico do padrão S=quantidade do padrão injetado. O cálculo da concentração de fumonisinas presente na amostra é feito de acordo com a fórmula abaixo:

$$C(\mu g) = \frac{A \times T \times D}{I \times W}$$

T= volume total da amostra derivada (250 μ L) D= fator de diluição, I=volume de injeção (20 μ L), W= massa da amostra derivada. Vários aspectos com relação à técnica analítica foram avaliados, incluindo a recuperação de cada fumonisina individualmente, a linearidade da curva padrão, o limite de detecção do método e a repetibilidade da técnica.

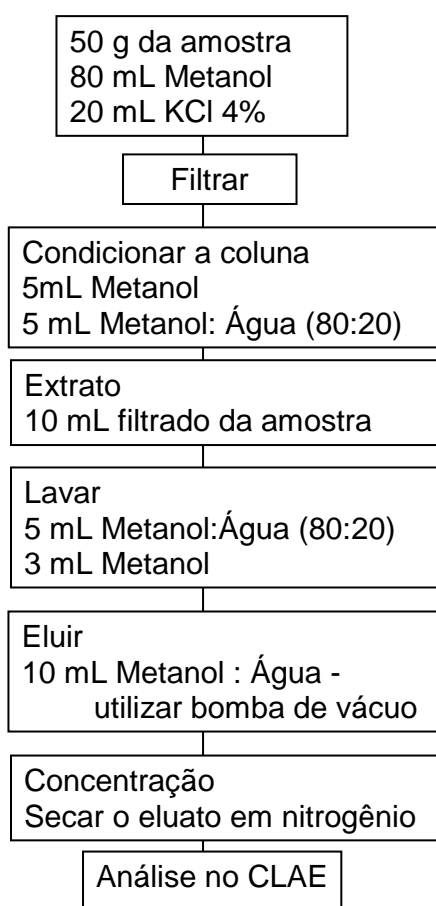


Figura 15: Fluxograma do método de análise de fumonisinas.

8.2.2. Determinação da umidade

Foi realizada conforme método AOAC (2005), em triplicata, a qual consiste em secagem da amostra em estufa ($110^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), baseado na remoção da água por aquecimento. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio, com massas previamente determinadas, ficando em estufa até a secagem. Os cadinhos contendo as amostras foram, então, resfriados à temperatura ambiente, em dessecador, tendo sua massa novamente determinada. Logo após, os cadinhos retornaram à estufa e este procedimento foi repetido até a obtenção de massa constante. Foi calculada, então, a porcentagem de umidade nas amostras e o desvio padrão considerando as análises em triplicata (Figura 16).

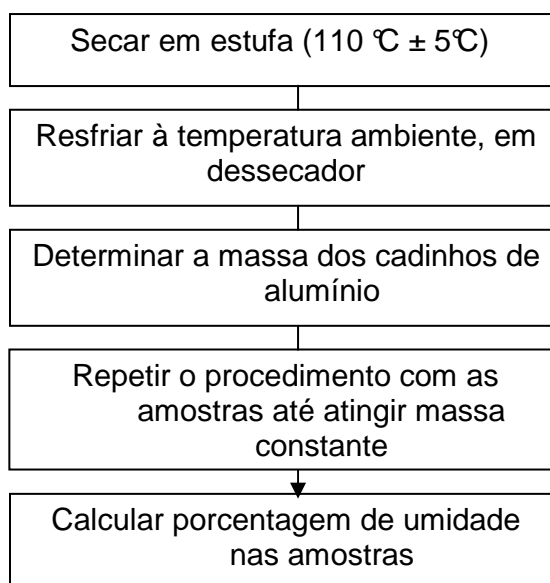


Figura 16: Fluxograma do método de análise de umidade.

8.2.3. Avaliação da estrutura e organização da propriedade

Através de levantamento de dados, visitas e questionários foi possível verificar as condições estruturais da propriedade rural, com relação a dados de natalidade, condições de armazenamento e processamento dos ingredientes e manejo dos animais.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Avaliação da contaminação por micotoxinas em ingredientes e rações para suínos

Dos ingredientes (milho, soja, casquinha de soja, farelo de arroz), resíduo da pré limpeza do milho e rações de vários estágios de desenvolvimento do suíno (gestação, engorda, inicial) avaliadas, quanto à presença de FBs, AFLs, ZON, OTA e EST, somente as FBs foram detectadas.

9.1.1. Fumonisinás

Quanto à contaminação por FBs do total de amostras analisadas (20), sete amostras (35%), apresentaram contaminação por FBs (Tabela 4). Foi possível observar que dos *ingredientes* avaliados, duas amostras de milho apresentaram contaminação por FB₁ com 0,238 e 0,830 mg.kg⁻¹ e FB₂ com 0,104 e 0,340 mg.kg⁻¹ = FBs total: 0,342 e 1,17 mg.kg⁻¹. Já, os outros ingredientes (soja, farelo de arroz e casquinha de soja) avaliados, não apresentaram contaminação pelas toxinas de *Fusarium* dentro da LOD e LOQ do método utilizado AOAC (2005).

Tabela 4: Análises de fumonisinas em ingredientes para suínos avaliadas em 2006

Data coleta	Ingrediente	FB ₁ (µg/kg)	FB ₂ (µg/kg)
02/10	Milho	0,830	0,340
17/10	Milho	0,238	0,104
23/11	Milho	ND	ND
12/12	Milho	ND	ND
17/10	Soja	ND	ND
23/11	Soja	ND	ND
12/12	Soja	ND	ND
17/10	Casquinha de soja	ND	ND
23/11	Casquinha de soja	ND	ND
12/12	Casquinha de soja	ND	ND
17/10	Farelo de arroz	ND	ND
23/11	Farelo de arroz	ND	ND
12/12	Farelo de arroz	ND	ND
Média de concentração de amostras contaminadas		0,534	0,222
Máximo de contaminação		0,830	0,340
Mínimo de contaminação		0,238	0,104

ND= não detectado

Já o nível médio de FB₁ nas *rações* de gestação e engorda (4 amostras) foi de 0.216 mg.kg⁻¹ (0,124 min.; 0,325 máx.) e de FB₂ 0,075 mg.kg⁻¹ (0,04 min;

0,110 máx.). Como esperado, o maior nível de contaminação por FBs totais foi registrado em amostras de resíduos da pré-limpeza do milho com 8,50 mg.kg⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5: Análises de fumonisina em rações para suínos avaliadas em 2006

Data coleta	Ração	FB ₁ (µg/kg)	FB ₂ (µg/kg)
02/10	Gestação	0,124	0,04
23/11	Gestação	0,325	0,11
12/12	Gestação	ND	ND
02/10	Engorda	0,158	0,06
23/11	Engorda	0,258	0,09
12/12	Engorda	ND	ND
Média de concentração de amostras contaminadas		0,216	0,075
Máximo de contaminação		0,325	0,110
Mínimo de contaminação		0,124	0,04

ND= Não detectado

A contaminação encontrada em ingredientes e rações para suínos foi baixa, com exceção dos resíduos de limpeza, que não são utilizados no preparo da ração que podem contaminar a mesma. Níveis baixos, porém constantes na dieta podem interferir a longo prazo na saúde e no desempenho reprodutivo dos suínos gerando danos econômicos na cadeia produtiva destes animais.

Portanto, se faz necessário o monitoramento das condições de cultivo dos ingredientes, transporte e armazenamento, para que não ocorra proliferação de fungos e micotoxinas, evitando assim problemas na criação de suínos.

9.1.2.OTA, EST, ZON e AFLs

Do total de amostras analisadas (44), não foi detectada a presença de OTA, EST, ZON e AFLs, tanto de ingredientes quanto para rações. Através do método cromatográfico empregado com LOD: 1 µg/L e LOQ: 2 µg/L, para cada uma destas micotoxinas, foi possível comprovar a segurança dos produtos analisados em relação a estas toxinas. Importante salientar que o método cromatográfico empregado tem capacidade de detectar níveis de contaminação abaixo do limite máximo da AFB₁ permitido pela legislação brasileira e européia, que é de 50 µg/kg e 20 µg/kg, respectivamente.

Portanto foi comprovada a qualidade das amostras quanto à contaminação por estas toxinas evitando assim problemas reprodutivos em suínos (abortos, natimortos, mumificados = ZON) e de produção (edema pulmonar, problemas hepáticos e renais= OTA, AFLs e EST).

9.2. Conteúdo de umidade das amostras de ingredientes e rações para suínos *versus* micotoxinas

O controle da umidade dos ingredientes e rações é de fundamental importância, uma vez que teores elevados aumentam as chances de proliferação de fungos e também produção de micotoxinas (toxinas de armazenagem: OTA, EST e AFIs). A umidade do alimento é influenciada diretamente pela temperatura ambiente e condições de armazenamento do produto. Os resultados das amostras avaliadas, coletadas no período de agosto a setembro de 2010, podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Conteúdos de umidade nas amostras de ingredientes e rações para suínos avaliados em 2010

Data coleta	Conteúdo de umidade (%)					
	Ingredientes				Rações	
	Soja	Farelo de arroz	Milho	Resíduo	Gestação	Inicial
01/08	12,48	9,14	12,07	12,22	11,90	11,99
19/08	14,15	9,76	13,12	12,93	12,54	11,97
06/09	13,34	9,79	12,31	12,55	12,24	12,87
28/09	11,94	9,26	12,34	10,39	11,24	11,94
Média	12,98	9,49	12,46	12,02	11,98	12,19
Max.	14,15	9,79	13,12	12,93	12,54	12,87
Min.	11,94	9,14	12,07	10,39	11,24	11,94
S	0,9743	0,3348	0,4553	1,1254	0,5586	0,4508

S= Desvio Padrão; Todas as análises foram feitas em triplicata.

Pode ser observado que ocorreu uma variação mensal do teor de umidade das amostras avaliadas, principalmente das amostras de soja (12,98%) e resíduo (12,02%) com um desvio padrão de 0,9743 e 1,1254, respectivamente. Essa variação provavelmente foi influenciada pelas condições climáticas, elevada umidade relativa do ar e temperatura do ambiente.

Do total de 24 amostras analisadas (Figura, 17 e 18), apenas duas amostras de soja apresentaram o valor de umidade (14,15 % e 13,34%) superior ao limite descrito em literatura como sendo ideal para o desenvolvimento de fungos que é de 13% (PEREIRA et al. , 2002).

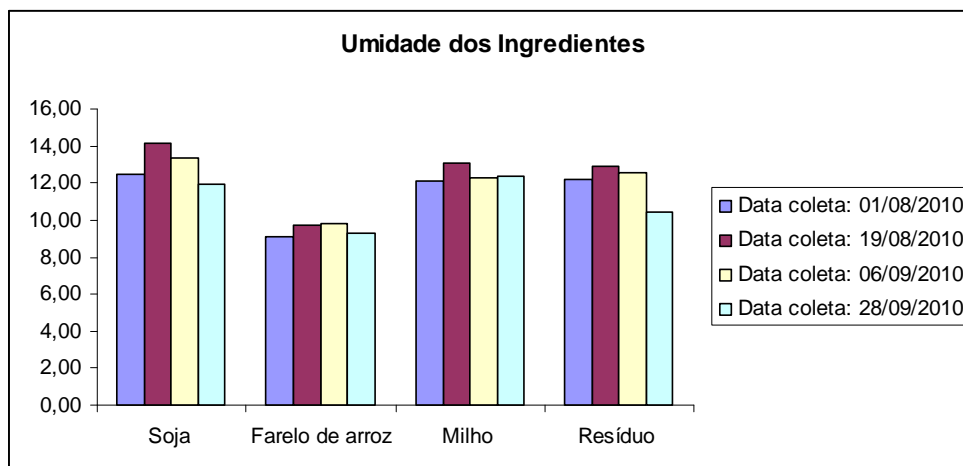


Figura 17: Conteúdo de umidade dos ingredientes utilizados para o preparo das rações para suínos.

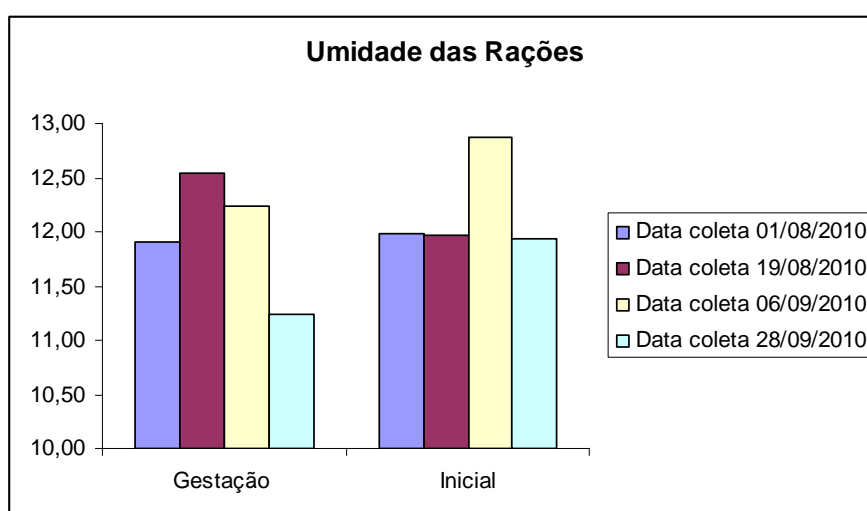


Figura 18: Conteúdo de umidade das rações administradas aos suínos no período de agosto a setembro de 2010.

9.3. Avaliação das condições higiênico sanitárias da propriedade

9.3.1. Armazenagem e processamento dos ingredientes e das rações

A propriedade possui um galpão específico onde são armazenados e processados os ingredientes e as rações para suínos.

Neste galpão existem dois silos de 20 e 50 toneladas, para armazenagem de soja e milho, respectivamente (Figura 19, (a) e (b)). É realizado um esvaziamento mensal dos silos, para limpeza, ajudando na prevenção da proliferação de fungos, insetos e roedores.



Figura 19: Armazenamento dos grãos em silos à granel e/ou sacarias:: (a) soja; (b) milho; (c) farelo de arroz e casquinha de soja.

A limpeza do milho é realizada na propriedade através de uma peneira que antecede o processo de moagem dos grãos. Esse processo elimina grãos quebrados, poeira e materiais estranhos que possam interferir na qualidade da alimentação do animal.

Os outros ingredientes, casquinha de soja e farelo de arroz são armazenados em sacas de 60 kg em lotes de 50 e 60 unidades respectivamente (Figura 19, (c)).

Após processadas as rações são armazenadas em sacas de 25 kg em lotes de 60 unidades ou conforme a necessidade e demanda do plantel.

O ambiente onde são armazenados e processados os ingredientes e rações é bem ventilado e possui limpeza periódica, porém o controle de temperatura e umidade não são realizados. Sendo que estes são os principais fatores para o desenvolvimento fúngico.

9.3.2. Instalações e manejo dos animais

A propriedade possui um plantel de 200 matrizes (ciclo completo) com um total de 2000 suínos. As instalações e sanitariedade (Figura 20) são bem controlados, visando sempre proporcionar aos animais a qualidade no seu desenvolvimento.

Para conseguir se adequar às necessidades do plantel e do mercado consumidor é necessário um constante monitoramento da qualidade das rações, genética e manejo empregado a estes animais.

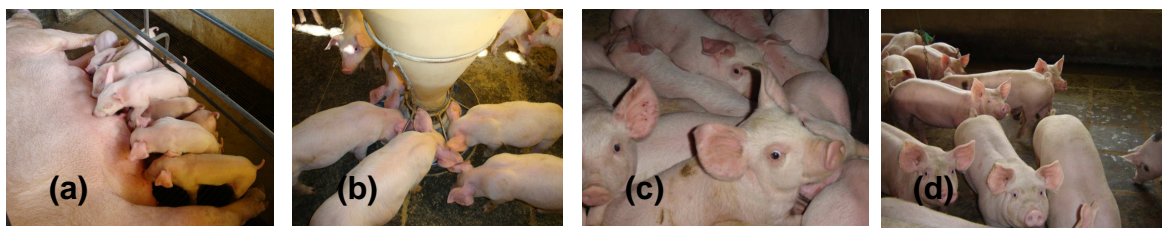


Figura 20: Instalações da propriedade onde foram realizados os estudos da qualidade de ingrediente e rações para suínos. (a) amamentação; (b) bebedouro para alimentação do suíno; (b) leitão; (c) suínos na fase de engorda.

9.4. Controle de natalidade de suínos e sua relação com a presença de micotoxinas nas rações

Foi avaliada quantitativamente a natalidade da propriedade rural no período de junho de 2007 a agosto de 2010, correlacionando com possíveis contaminações por micotoxinas na alimentação. A média de nascimento mensal é de 430 suínos (min 398,86, máx 484,25). A taxa de mortalidade anual representa 10,97% (min 9,76%, máx 12,22%). Neste percentual é considerado o número leitões natimortos, os quais nasceram mortos mas com perfeito desenvolvimento externo (Figura 21, (a) e (b)).

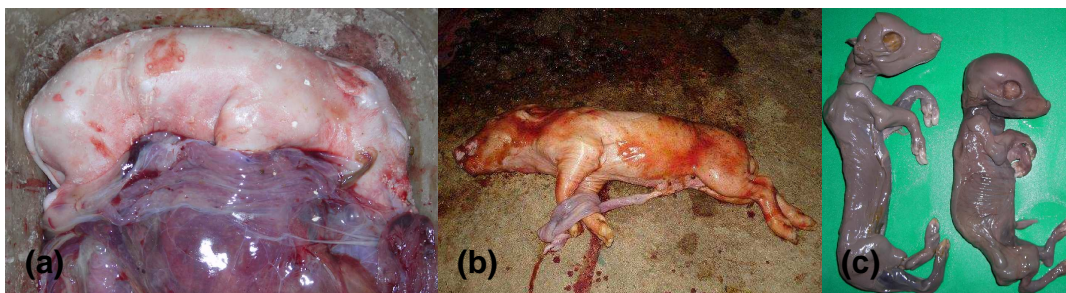


Figura 21: Alterações em leitões observados durante o parto: (a) e (b) natimortos. (c) mumificados.

O número de leitões mumificados (Figura 21, (c)) também bastante elevado, sendo mensalmente observado cerca de 54 mumificados, o que representou 2,06% do total de nascimentos (Figura 22).

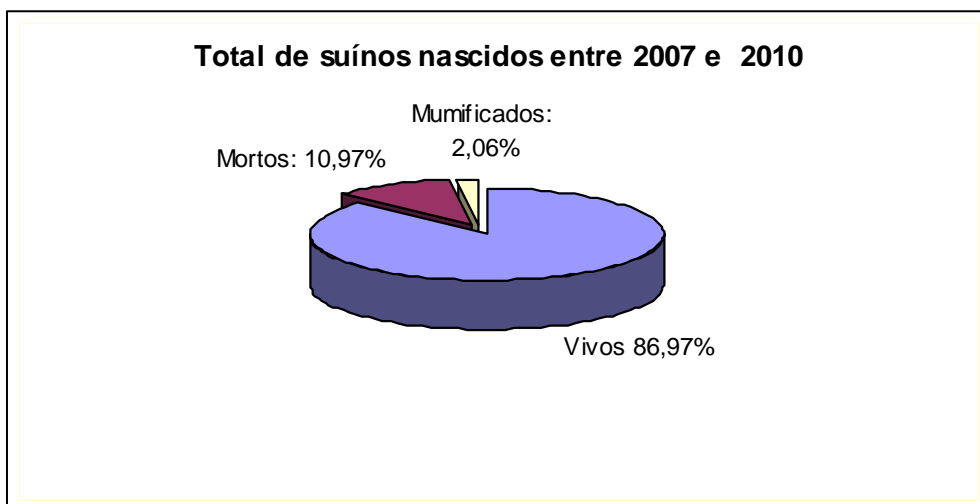


Figura 22: Total de suínos nascido entre 2007 e 2010.

No mês de junho de 2009 foi observado o maior percentual de mumificados (3,49%). Embora sejam necessárias maiores análises, a presença micotoxinas na alimentação destes animais pode ser um forte indicativo dos baixos índices reprodutivos existentes na propriedade (Tabela 7).

Tabela 7: Controle de natalidade 2007 a 2010

Período	Vivos			Mortos			Mumificados			Total**
	Nº Total	(%)	Media*	Nº Total	(%)	Média*	Nº Total	(%)	Média*	
Junho a dezembro - 2007	2792	87,66	398,86	311	9,76	44,43	82	2,57	11,71	3185
Janeiro a dezembro - 2008	5310	85,62	408,46	758	12,2	58,31	134	2,16	10,31	6202
Janeiro a dezembro - 2009	5636	86,73	433,54	726	11,17	55,85	136	2,09	10,46	6498
Janeiro a agosto - 2010	3874	88,75	484,25	426	9,76	53,25	65	1,49	8,13	4365
TOTAL	17612	86,97	430,00	2221	10,97	54,02	417	2,06	10,16	20250

* média mensal; ** inclui todos os nascidos (vivos, mortos, mumificados).

10. CONCLUSÕES

A qualidade da alimentação animal vem sendo aprimorada, na busca de uma melhor nutrição, saúde e desenvolvimento. Neste trabalho foram avaliados ingredientes e rações para suínos quanto à possível contaminação por micotoxinas.

Através de análises, que forneceram dados positivos para FBs, foi verificado que é necessário um constante monitoramento do processamento das rações e do armazenamento do produto, bem como a compra adequada de matéria prima isenta de contaminação. Nenhuma amostra apresentou contaminação por OTA, AFIs, ZON e EST. Foram verificados na propriedade dados elevados de abortos (2,06%) e natimortos (10,97%) o que eventualmente pode ter sido ocasionado pela presença destes contaminantes alimentares.

É necessário que exista uma legislação vigente, para todas as micotoxinas, e não apenas para as AFLs, para que o controle da qualidade seja melhor implantado e fiscalizado pelas autoridades.

O ambiente em que se encontram os ingredientes e rações deve ser monitorado, uma vez que fatores, como umidade e temperatura são influenciados pelas instalações, e em casos de condições inadequadas causam o desenvolvimento fúngico e proliferação de micotoxinas.

Além disso, o estágio realizado e principalmente a participação no grupo de pesquisa LABMICO, colaborou para o discernimento e o aprimoramento de conhecimentos químicos empregados em análises de micotoxinas, através do emprego de técnicas de extração e cromatográficas.

Para trabalhos futuros é necessário um acompanhamento da qualidade dos produtos, por um maior período de tempo, para que mais dados possam ser obtidos através de análises laboratoriais com possibilidade de correlacionar contaminação com o nascimento e desenvolvimento de animais na propriedade. O intuito é implementar o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na fábrica de ração da propriedade. Para tal implementação será necessário a avaliação dos pontos críticos e estabelecimento de formas de controle relacionando a desencadeamento de fungos e micotoxinas.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRED, D.; MAGAN, N.; OLSEN, M. The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. **Woodhead Publishing**, 2004.

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BORKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislations with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, p. 173-183, 2002.

AOAC. Association Official Method of Analysis of AOAC internacional. Thiex, NJW (E.d.) Animal feed. Art 965-16. Sampling of animal feed and food. Art. 930.15. 18 ed. Maryland: AOAC internacional 2005.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**, 1. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Inc, 2003.

BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, p. 149-166, 2007.

BITTENCOURT, C.A.F.; OLIVEIRA, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, p. 117-120, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA nº7 de 9 de Nov. de 1988. **Diário Oficial da União**, 9 nov. 1988. Sec. I, p. 21.968.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Limite máximos de micotoxinas da proposta de resolução em consulta publica, 2010 Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/ e-legs](http://www.anvisa.gov.br/e-legs)>. Acesso em: 10 nov. 2010.

CALDAS, E. D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.A. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CASADO, J.M.; THEUMER, M.; MASI, D.T.; CHULZE, S.; RUBINSTEIN, H.R. experimental subchronic mycotoxicosis in mice: individual and combined effects of dietary exposure to fumonisins and aflatoxin B1. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p. 579-586, 2001.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 700-710, 2007.

CELESTE, M.; LINO, L. J. G.; SILVA, A. P. Metodologias analíticas para a determinação de biomarcadores de fumonisinas em amostras biológicas **Química** 106, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Princípios básicos da cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos**, 6 ed. Campinas: Unicamp, 1995.

CONCA, R.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; HAJOS, P. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. **Analytical Chimica Acta**, 2001.

CONKOVÁ, E.; LACIANOVÁ, A.; KOVÁČ, G; SEIDEL H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v. 165, p. 214-220, 2003.

CRUZ, Juliana Victorino da Silva. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho utilizando como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 88 f. Dissertação (Doutorado) - USP, Pirassununga, 2010.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, n.7, 1998.

DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J.; Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet. Human Toxicology**, v. 36, n.6, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.187-191, 2002.

FARACO R. F. P.; PIRES M. C.; ROCHA A. P. C.; PRADO M. A. F. Macrolactamas bioativas e síntese de macrociclos por reação de carbociclicização radicalar mediada por hidreto de tri-*n*-butilestanho. **Química Nova**, v.31, 2008.

FONSECA, H. Legislação sobre micotoxinas. Piracicaba, 2010. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br/legila.html> Acesso em: 11 nov. 2010.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A. J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 309-320, 2002.

HAYASHI, L. **Anticorpo Monoclonal Anti-AFB1: Coluna de imunoafinidade e espectrofluorimetria para controle de qualidade de alimentos**. 2007. 104 f. 2007 (Mestrado) - Curso de Mestrado Ciência dos Alimentos, UEL, Londrina, 2007.

HUSSEIN S.; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p.101–134, 2001.

KATZ, E.; EKSTEEN, R.; SCHOENMAKERS, P.; MILLER, N. **Chromatography Handbook of HPLC**, 1. ed. Washington: Academic Press, 1998.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidas e comercializadas em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 f. Dissertação (Doutorado) - UEC, Campinas, 2004.

LOVATTO P.A.; LEHNEN C.R.; CAVAZINI N.; BERTOLIN K.; HAUSCHILD L. Relação entre fumonisinas na dieta de leitões na creche e a ocorrência do vício de sucção, desempenho e características de alguns órgãos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 004, 2007.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO JM, WENTZ I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria. p.635-43. 1994.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. PORTARIA MA/SNAD/SFA NO. 07, DE 09/11/88 - PUBLICADA NO DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO DE 09 DE NOVEMBRO DE 1988 - SEÇÃO I, PÁGINA 21.968, 1988.

MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks know or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, 2007.

MULLER, G.; BURKERT, B.; MOLLER, U.; DILLER, R.; ROHRMANN, B.; ROSNER H.; KOHLER, H. Ochratoxin A and some of its derivatives moluate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. **Toxicology**. V.199, n2-3, p.251-259, 2004.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**, 3. ed. Leiden: Taylor e Francis, 2006.

NOLLET, L. M. L. **Food Analysis by HPLC**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2007.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 141-156, jan./jun. 2002.

PITT, J.; HOCKING, A. Fungi and food spoilage, **An Aspen publication**, 2nd ed p. 387-383, 1999.

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

RODRIGUES, J. ; LOPES M.R. Aflatoxinas **Biotoxicologia**, Faculdade de Farmácia Universidade do Porto p.1-16. 2009.

SANTOS, I.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Fungos contaminantes na indústria alimentar. **Micoteca da Universidade do Minho**, Centro de Engenharia Biológica, p. 98, 1998.

SCOTT, M. Penicillium and Aspergillus toxins. **Mycotoxins in Grain- Compounds Other than Aflatoxin**. St. Paul, USA, p. 261-285, 1994.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**, 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SCUSSEL, V. M.; BEBER, M.; de SOUZA KOERICH, K. Problemas de micotoxinas nos grãos e os novos limites toleráveis na cadeia alimentar. **5ª Conferencia Brasileira de pós colheita**, Foz do Iguaçu, 2010.

SHEPARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography**, v. 185, n.1, p.31-39, 1998.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Washington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1998.

VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Analytical Chimica Acta**, v. 391, p. 159- 71, 1999.

VAN EGMOND, H. P. Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. Mycotoxins in dairy products. **Elsevier Science**, cap 2, p. 3-39, 2003.

VLATA, Z.; PORICHIS, F.; TZANAKAKIS, G.; TSATSAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology Letters**, v. 165, p. 274-281, 2006.

YU J, CLEVELAND TE, NIERMAN WC, BENNETT JW. Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases **Rev Iberoam Micol**. p.194-202. 2005.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA AMR, ROZZA DB, DRIEMEIER D, MALLMANN CA, MIGLIAVACCA FA. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul, **Pesq. Vet. Bras**. p. 207-210, 2004.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006.